

## Chương XII

# CHIẾN LƯỢC TIỀN APOPTOSIS TRONG GEN TRỊ LIỆU UNG THƯ

### MỞ ĐẦU

Với những dẫn liệu sẵn có gần đây về trình tự hệ gen người thì gen trị liệu rõ ràng là niềm hy vọng lớn trong việc phát triển các công cụ tin sinh học để phân tích các kết quả này. Hơn nữa, sự hiểu biết của chúng ta về nguyên nhân gây ung thư cũng được mở rộng nhanh chóng cùng với việc phát triển các công cụ genomic, proteomic và metabolomic. Khi phân tích các công cụ tin sinh học phát triển một cách liên tục chúng ta càng thấu hiểu các con đường tín hiệu tế bào gây nhiễu trong ung thư. Do vậy, hiện nay đã có rất nhiều gen có khả năng cài được vào ung thư để sửa chữa tốt hơn những sai lệch về tăng trưởng.

Khó khăn không phải là ở chỗ lựa chọn các gen mà là khả năng chuyển giao một gen hiệu chỉnh hay có thể gây chết tới bất kỳ tế bào ung thư nào trong các ứng dụng gen trị liệu. Vấn đề này khá phức tạp bởi vì cần phải chuyển được gen trị liệu tới các khối u ở các vị trí di căn rất xa.

Hiện nay gen trị liệu chưa thể áp dụng tốt công nghệ này. Nếu đưa vào thật chuẩn các gen thông qua virus, các DNA trần hoặc được đóng gói trong các liposom cũng chỉ có thể tải nạp được 25-30% tế bào trong khối u. Về vấn đề chuyển giao bởi virus, nhiều TB khối u biểu hiện không ổn định các receptor cho phép virus tương tác do đó mà sự chuyển gen trong nhiều trường hợp bắt buộc phải đạt tới mức thâm nhiễm tương đối cao từ 25 đến 30%. Vì vậy cần phải cải tiến các vec tơ virus và một nhóm gồm nhiều nhà khoa học hiện đang thực thi công việc này.

Một cách tiếp cận bổ sung khác có thể là xác định và chuyển giao các gen không những gây chết tế bào do apoptosis mà còn tạo các tín hiệu gây chết bổ sung thoáng qua tới các tế bào khối u bên cạnh để thừa nhận cái gọi là hiệu ứng người ngoài cuộc.

Trong chương này chúng tôi sẽ đề cập tới việc sử dụng các phân tử để cảm ứng apoptosis, một số chất thể hiện khả năng hoạt hóa hoạt tính người ngoài cuộc. Trước hết chúng ta hãy bàn luận về các trị liệu người ngoài cuộc của tiền thuốc, các protein họ *Bcl-2*, các gen receptor gây chết và việc thay thế chức năng các gen kiểm chế khối u. Cuối cùng sẽ bàn luận về thực trạng hiện nay của các TNLS khi sử dụng gen trị liệu tiền apoptosis cùng các trị liệu tổ hợp để đạt được hiệu ứng người ngoài cuộc.

### CÁC TRỊ LIỆU TIỀN THUỐC

Trị liệu tiền thuốc sử dụng các gen được chuyển giao ngoại sinh để chuyển đổi các tiền thuốc thành các chất tương tự mang độc tính có khả năng cảm ứng apoptosis. Các chất tương tự có độc tính này gây ảnh hưởng tới sự tổng hợp DNA do nó hợp nhất vào các chuỗi DNA đang phát triển nên kết thúc sự sao chép DNA. Có 2 ví dụ điển hình của chiến lược này là thymidin kinase (TK) và cytosin deaminase (CD), chúng chuyển đổi ganciclovir (GCV) và 5-fluorocytosin thành các dạng thuốc có độc tính. Đã có nhiều báo cáo về các thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng áp dụng phương pháp này, mặc dầu kết quả nói chung vẫn chưa rõ ràng. Một cách tiếp cận

được sử dụng với việc chuyển thẳng một TK biểu hiện bởi adenovirus dưới sự kiểm soát của một promoter đặc hiệu mô đã cho thấy có hiệu ứng vừa phải đối với ung thư tuyến tiền liệt.

Những nghiên cứu khác cũng góp phần vào việc tìm hiểu các cơ chế tín hiệu tế bào xảy ra sau khi xử lý với TK-GCV. Chẳng hạn như TK-GCV đã thể hiện là có gây cảm ứng giải phóng cytochrom C từ ty thể trong các tế bào khối u của u nguyên bào sợi. Hơn nữa, nghiên cứu này còn chứng minh rằng sự hoạt hóa caspase hiệu ứng là phụ thuộc vào ty thể. Nó cũng chỉ rõ rằng TK-GCV đã cảm ứng gây chết tế bào bằng cách tăng cường các chủ vận receptor gây chết CD95L (Fas ligand).

Trị liệu tiền thuốc kết hợp gen trị liệu đưa caspase 3 tổ hợp với TK vào để điều trị ung thư buồng trứng. Nhóm nghiên cứu của LeMoine đã chứng minh rằng sự biểu hiện của TK từ một vec tơ adenovirus cộng với GCV sẽ dẫn đến sự chết tế bào trong các TB ung thư buồng trứng *in vitro*, nó có thể được khuếch đại lên nhiều nếu các TB ung thư buồng trứng được công nghệ hóa để biểu hiện caspase. Vấn đề này liên quan tới việc hoạt hóa procaspase 3 theo con đường tiền thuốc này. Cũng liên quan với cách tiếp cận này là các tế bào ung thư có thể được thâm nhiễm bởi cả các virus biểu hiện TK cũng như virus biểu hiện procaspase 3 thì mới khuếch đại được trong các điều kiện lâm sàng.

## **PROTEIN HỌ Bcl-2**

Có trên 20 protein trong họ Bcl-2 thể hiện chức năng tiền apoptosis hoặc kháng apoptosis. Hầu hết chúng đều chứa một domain vận chuyên màng đầu tận C kỵ nước làm nhiệm vụ neo chúng vào màng. Tuy nhiên, cũng có vài thành viên họ này xuất hiện ở tế bào chất. Các protein họ Bcl-2 được đặc trưng bởi các domain BH tương ứng Bcl-2.

Có 4 domain BH khác nhau và một số protein họ Bcl-2 có chứa tất cả 4 domain. Đặc biệt là domain BH1 và BH2 cho phép sự dimer hóa dị loại (heterodimerization) với Bax để làm thoái lui sự chết theo chương trình của tế bào (programmed cell death –PCD). Domain BH3 xuất hiện với chức năng cho phép sự dimer hóa dị loại giữa Bcl-x<sub>L</sub> và Bcl-2 với các thành viên họ đồng vận (Bax, Bak) để thúc đẩy sự chết theo chương trình của tế bào. Domain BH4 được duy trì trong các thành viên kháng đồng vận của họ này (Bcl-x<sub>L</sub>), nhưng có xu hướng vắng mặt trong các thành viên đồng vận, và vận hành để cho phép tương tác với các protein điều hòa gây chết như Apaf -1 và Bad.

Nhiều thành viên họ Bcl-2 có thể được điều hòa sau dịch mã bằng việc phosphoryl hóa domain vòng (có thể biến đổi được) làm thay đổi hoạt tính của chúng. Các nghiên cứu đã sử dụng Bcl-x<sub>L</sub> và Bax để chứng minh khả năng của các thành viên họ Bcl-2 đối với việc hình thành các lỗ chọn lọc ion (ion-selective pore) trên màng. Một số phân tử này như Bcl-2 ức chế pha chuyển đổi tính thấm (permeability transition pha) và ngăn chặn apoptosis. Một số khác như Bax lại ngược với hiệu ứng này. Nhiều bệnh ung thư xuất hiện với việc điều hòa xuống các thành viên kháng apoptosis thuộc họ Bcl-2. Vì thế có một chiến lược trị liệu cho biểu hiện quá mức các thành viên tiền apoptosis (Bax). Một trong những chức năng chính của các thành viên tiền apoptosis của họ này là biến đổi và có thể thâm nhập vào các màng trong và ngoài của ty thể để giải phóng cytochrom C. Cytochrom C tương tác với Apaf -1 và caspase 9 để hình thành nên thể apoptosis (apoptosome), truyền tín hiệu apoptosis nhờ việc hoạt hóa caspase 9. Khi các phân tử như Bcl-2 và Bcl-x<sub>L</sub> được biểu hiện quá mức trong ung thư thì sự giải phóng cytochrom C khỏi ty thể sẽ giảm đi hoặc bị khóa lại,

ngăn chặn sự hoạt hóa con đường tín hiệu gây chết qua trung gian thể apoptosis (apoptosome). Để xác định vai trò trị liệu của chúng trong cảm ứng apoptosis, nhiều thành viên họ Bcl-2 đã được sử dụng trong các thử nghiệm gen trị liệu bao gồm Bax, Bak, Bad, Bcl-x<sub>S</sub>, Bcl-Rambo, Blk, Harakiri và Bim.

## **Bax**

Bax có lẽ là thành viên được nghiên cứu kỹ nhất trong họ này liên quan đến gen trị liệu. Bax là một protein 21 – kDa hòa tan của tế bào được huy động trong đáp ứng với các tín hiệu gây chết TB; nó chuyển vị tới màng ty thể, ở đó tạo nên một cấu trúc gắn màng thông qua sự thay đổi cấu trúc đầu tận c. Nhiều nghiên cứu đang hướng vào vai trò của Bax (được chuyển giao bởi adenovirus) đối với ung thư buồng trứng, tuyến tiền liệt hoặc các mô hình phát triển tế bào mô đệm chuột đồng gen hay chuột nude. Trong hầu hết các nghiên cứu này, đã thu được những kết quả trị liệu hiệu quả khả quan, điều đó cho thấy Bax là một chất cảm ứng apoptosis tương đối mạnh.

Bax cũng sử dụng thành công khi kết hợp với tiền apoptosis Bad trong công trình nghiên cứu của Marcelli và cộng sự - người đã chứng minh sự biểu hiện được điều hòa bởi androgen của Bax trong dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt người LNCaP có thể làm chậm lại sự tăng trưởng của các khối u ghép ngoại lai ở chuột nude. Tuy nhiên, nó cũng xác định rằng các khối u LNCaP sau khi được xử lý với adenovirus biểu hiện Bad cuối cùng cũng hồi phục lại được khả năng tăng trưởng. Nếu chúng được xử lý kết hợp với adenovirus biểu hiện Bax và Bad thì một số khối u biến mất hoàn toàn cuối kỳ điều trị mà không bị tái lại 8 tuần sau đó.

Tại sao người ta vẫn chưa rõ về sự thành công của phương pháp này, có lẽ vì việc chuyển giao adenovirus tới các khối u đặc *in vivo* chỉ có thể đạt tới hiệu ứng tốt nhất là 25-30%. Vì thế có thể kết luận được rằng sự kết hợp Bad/Bax như đã mô tả ở trên đã cảm ứng hoạt tính người ngoài cuộc tại khối u hoặc cảm ứng đáp ứng qua trung gian miễn dịch như ở mô hình chuột nude. Điều này cũng giống như các tế bào bạch cầu trung tính hay tế bào giết tự nhiên làm trung gian trong việc tiêu diệt khối u. Những hệ thống này vẫn chưa được hiểu tường tận vì vậy cần phải có các nghiên cứu sâu hơn nữa, không những chỉ là việc đưa vào các thành viên họ Bcl-2 mà còn phải thực nghiệm với nhiều kiểu gen trị liệu khác nữa.

## **Bik, Blk, Bcl-Rambo, Bak, Bid, Bim và Harakiri**

Tiền apoptosis Bik được phát hiện trên nhiễm sắc thể 22Q, có liên quan tới phát triển ung thư trực kết tràng và ung thư vú khi được điều hòa xuống. Protein này có trọng lượng phân tử 18000 kDa, có chứa một domain BH3 đơn, nên cho phép tạo thành các dimer dị loại với Bcl-2 và Bcl-x<sub>L</sub>. Sự liên kết này tạo nên kiểu hình tiền apoptosis thông qua con đường độc lập p53. Trong các nghiên cứu thực hiện ở Viện MD Anderson, Bik được phân phối như một nhũ dịch plasmid DNA/cationic lipid dùng để xử lý các dòng TB ung thư vú người và ghép ngoại lai và đã được chứng minh là gây cảm ứng apoptosis trong các mô hình này. Khi phân phối toàn hệ thống qua đường tĩnh mạch chuột thấy cảm ứng tốt apoptosis khối u như trong thực nghiệm của TUNEL; có ít hoặc không có apoptosis hiện diện ở gan. Cách xử lý này đã kéo dài rất nhiều thời gian sống sót của chuột nude được cấy ghép ngoại lai di căn MDA-MB-468. Cơ chế kéo dài thời gian sống sót vẫn chưa được sáng tỏ hoàn toàn vì như các báo trước đã đề cập nó còn liên quan tới hiệu ứng của việc chuyển gen Bik tới các TB khối u. Protein Blk của chuột liên quan tới Bik cũng có một số đặc tính của Bik người như có domain BH3 để cảm ứng PCD (sự chết TB theo chương trình) ở các mô chuột. Nó hiện diện ở thận, phổi và tim, nhưng không có ở cơ xương, lách và não.

Biểu hiện cao nhất quan sát thấy ở gan và thận và mẫu biểu hiện này khác với Bik. Hơn nữa, protein này lại định vị vào màng ty thể, chứng tỏ một hiệu ứng gây chết tiềm tàng liên quan đến sự kìm hãm các protein kháng apoptosis Bcl-2 và Bcl-x<sub>L</sub>. Bik xuất hiện chức năng thông qua ty thể bởi vì nó hoạt hóa caspase 9. Bik chưa được chuyển giao tới các khối u ghép ngoại lai trong các nghiên cứu về chức năng. Có nhiều phân tử tiền apoptosis tiềm năng khác có thể được áp dụng cho gen trị liệu điều trị ung thư. Protein Bcl-Rambo là một tương đồng của Bcl-2, nó gây cảm ứng apoptosis thông qua việc duỗi dài ra đầu tận c độc quyền. Phân tử này có vẻ như định vị vào ty thể và khi biểu hiện quá mức thì sẽ cảm ứng apoptosis và có thể bị ngăn chặn bởi một thành viên họ IAP xuôi dòng (downstream) do ức chế các caspase hiệu ứng. Các chất ức chế caspase ngược dòng (upstream) như FLIP và FADD âm tính trội không có hiệu ứng, thế thì rõ ràng là Bcl-Rambo sử dụng hiệu ứng tiền apoptosis thông qua ty thể.

Bax là một phân tử tiền apoptosis khác có hiệu ứng trong điều trị các TB ung thư cả *in vivo* và *in vitro*. *In vivo*, Bax đã được chuyển tới TB ung thư nhờ sử dụng hệ adenovirus. Chức năng của Bak giống như Bax là kìm chế chức năng của Bcl-2 và cảm ứng apoptosis bằng việc giải phóng cytochrome c khỏi ty thể. Tuy nhiên, tín hiệu xuyên qua Bak xuất hiện là thông qua caspase 3 (MG-7) bởi vì ít nhất là có một nghiên cứu trong đó tế bào thiếu caspase chức năng 3, Bak thì chỉ có hiệu ứng rất thấp trong cảm ứng apoptosis. Điều này hơi khác đôi chút với Bax, trong đó cả con đường hoạt hóa phụ thuộc caspase và không phụ thuộc caspase đều tồn tại. Cả Bax và Bak đều là những tác nhân lý tưởng cho trị liệu các ung thư có biểu hiện quá nhiều Bcl-2, bởi vì adenovirus biểu hiện quá mức một cách đặc hiệu các gen chuyển do vậy làm cho nó có khả năng vượt qua được các mức cao của thành viên Bcl-2 kháng apoptosis trong tế bào và cảm ứng được PCD.

Một phân tử khác xứng đáng được xem xét cho trị liệu phân tử là Bid- một phân tử có chứa BH3. Bid trở nên hoạt hóa (t-Bid) sau sự phân cắt caspase 8 và chuyển vị tới ty thể, tạo thuận lợi cho sự oligo hóa Bax, cho phép giải phóng cytochrom C và sau đó là apoptosis. Tuy nhiên, cho tới nay người ta vẫn chưa tìm thấy bất kỳ đối chiếu nào về việc sử dụng phân tử này trong gen trị liệu.

Một phân tử có tên là Harakiri (HRK) đã được phân dòng và được xác định là tương tác một cách chọn lọc với Bcl-2 và Bcl-x<sub>L</sub> để thúc đẩy apoptosis. HRK thiếu cả vùng tương đồng BH1 và BH2, nhưng lại có vùng BH3 tương ứng cao với họ Bcl-2. Sự xuất hiện thành viên này của họ Bcl-2 là để tham gia vào việc tương tác trực tiếp với Bcl-2 và Bcl-x<sub>L</sub> nhằm thực hiện tín hiệu apoptosis của ty thể. Tuy nhiên, việc sử dụng nó trong gen trị liệu thì vẫn còn rất hạn chế.

Cuối cùng là một biến thể ghép của Bcl-x<sub>L</sub> và Bcl-x<sub>S</sub> là tiền thân apoptosis và đã được chứng minh trong cách tiếp cận gen trị liệu để cảm ứng apoptosis sự ghép ngoại lai khối u vú người. Công trình này đã được thực hiện với adenovirus thế hệ thứ nhất với hiệu quả hạn chế; tuy nhiên, apoptosis cũng đáng được ghi nhận trong nghiên cứu này.

Tóm lại, có nhiều vấn đề liên quan đến cơ chế tác động của Bcl-2, nhiều thành viên trong họ này có vai trò ức chế chọn lọc apoptosis khối u. Một vài kết quả ngạc nhiên về hiệu lực của các phân tử này trong việc cảm ứng apoptosis *in vitro* và *in vivo* đã được bàn luận và đã gợi lên rằng sự cảm ứng apoptosis các khối u đã được thiết lập là một cách tiếp cận gen trị liệu hợp lý và rất triển vọng.

## **RECEPTOR GÂY CHẾT, CÁC CON ĐƯỜNG VÀ HỆ THỐNG LIGAND**

Có nhiều hệ receptor/ligand gây chết có thể thực hiện chức năng điều hòa apoptosis trong các tế bào, bao gồm yếu tố hoại tử u –  $\alpha$ , ligand cảm ứng apoptosis liên quan đến yếu tố hoại tử u (tumor necrosis factor –related apoptosis inducing ligand –TRAIL) và ligand Fas (FasL). Nói chung, các ligand này thực hiện chức năng vào điểm gần kết thúc con đường cảm ứng apoptosis bằng cách thay đổi cấu trúc các receptor tương ứng của chúng. Những thay đổi này sẽ tạo nên phức hợp tín hiệu cảm ứng gây chết (death signaling complex –DISC) có khả năng tuyển mộ các phân tử bổ sung dẫn đến hoạt hóa caspase 8 hoặc 10 do các cơ chế phân cắt tự động. Caspase 8 và 10 sau đó hoạt hóa trực tiếp các caspase “đao phủ” (executioner) như caspase 3 và 7. Cách khác là caspase khởi đầu có thể phân cắt phân tử tiền apoptosis Bid thành phiên bản xén bớt của nó (t-Bid), rồi tương tác với Bax, Bak và các phân tử khác trên màng ty thể, cuối cùng giải phóng ra cytochrom C. Cytochrom C sau đó lại tương tác với Apaf -1 và caspase 9 thành một phức hợp được hiểu là thể apoptosis (apoptosome) để hoạt hóa caspase 9, sau đó hoạt hóa caspase 3, 7 và/ hoặc các caspase khác và cảm ứng apoptosis.

Nhiều công trình đã được thực hiện với việc sử dụng TRAIL, FasL và FADD âm trội (thành phần cần thiết của tín hiệu FasL trên DISC) để cảm ứng apoptosis trong các TB khối u. Có một vài khía cạnh thú vị liên quan tới những cách tiếp cận này. Thứ nhất là người ta quan sát thấy việc phân phối TRAIL và FasL với tư cách là các phân tử tự nhiên hay liên kết ngang tới nhiều dạng tế bào ung thư khác nhau là không hiệu quả. Lý do của vấn đề này thường không phải do thiếu receptor gây chết mà là có sự hiện diện của các phân tử ức chế hình thành DISC và sự phân cắt tự động của caspase 8 như cFLIP. Điều cần quan tâm là khi các hệ virus đã được sử dụng để chuyên giao FasL hay TRAIL tới các TB này thì con đường tín hiệu receptor gây chết không thiết yếu kém hiệu ứng đã được khắc phục bằng cách điều hòa xuống cFLIP và/ hoặc IAP hoặc bởi các cơ chế khác trong đó có cả sự tổng hợp *de novo* để khởi đầu apoptosis qua trung gian đáp ứng stress.

Trong trường hợp với cả TRAIL, FasL, nếu tế bào đã được cảm ứng bởi virus bị chết mà dẫn đến hình thành các túi apoptosis ở các TB chết thì có khả năng TRAIL hoặc FasL được trình diện tới các tế bào lân cận. Nếu các tế bào lân cận đáp ứng với FasL hoặc TRAIL thì apoptosis được trung gian bởi hiệu ứng người ngoài cuộc sẽ xảy ra (tức là khuếch đại tín hiệu gây chết). Tuy nhiên, nếu các TB khối u thuộc tiểu quần thể khối u kháng với tín hiệu ngoại sinh thì lợi thế về sự chết TB qua trung gian người ngoài cuộc là thấp trừ khi xảy ra hiện tượng tăng cường đáp ứng miễn dịch. Rõ ràng là hệ miễn dịch có vai trò quan trọng đối với việc trừ diệt khối u.

Có nhiều phòng thí nghiệm đang khảo sát các cách điều hòa xuống các phân tử ức chế apoptosis tế bào như cFLIP và IAP để làm nhạy cảm ung thư đối với các tín hiệu apoptosis. Tổ hợp các trị liệu với các phân tử nhỏ như anthracyclin, triterpenoid, các chất hóa trị liệu tương đồng nucleosid, taxol, ceramid và các chất ức chế ceramid,... có thể khuếch đại hoạt tính người ngoài cuộc của ligand gây chết do điều hòa xuống các phân tử ức chế apoptosis.

Có nhiều nghiên cứu chứng minh rằng khi biểu hiện quá mức caspase sẽ gây cảm ứng apoptosis trong các TB khối u. Mặc dầu các caspase có tiềm năng gây nên sự chết TB trong các TB tải nạp nhưng chúng cũng hứng chịu những cạm bẫy tương tự như những protein họ Bcl-2 trong đó nhiều protein lại không cảm ứng hiệu ứng người ngoài cuộc. Vì thế có ít cơ hội để xóa bỏ hoàn toàn khối u do những hạn chế của việc chuyển các gen được biểu hiện bởi adenovirus vào trong tất cả các TB khối u. Trái lại,

khi sử dụng cả TRAIL và FasL, do việc xuất hiện các túi apoptosis mà sau đó biểu hiện được ligand chức năng gây chết nên đã làm lợi rất nhiều cho gen trị liệu.

## **CÁC GEN KIỂM CHẾ KHỐI U CÓ THỂ THỰC HIỆN CHỨC NĂNG CẢM ỨNG APOPTOSIS**

Các gen kiểm chế khối u thực hiện chức năng điều hòa sự phân chia và apoptosis của tế bào. Các khối u ác tính thường xuất hiện do sự thiếu hụt chức năng hoặc do thiếu năng một hoặc nhiều gen kiểm chế khối u. Trong thực tế, mất điều hòa con đường p53/MDM/p14<sup>ARE</sup> và pRb/p16/CK4/cyc D có lẽ là yếu tố cơ bản phát sinh ra hầu hết các bệnh ung thư ở người bởi vì nó làm gián đoạn sự điều hòa chu kỳ tế bào và khử hoạt hóa đáp ứng apoptosis. Vì thế, một trong số các chiến lược được sử dụng trong gen trị liệu là thay thế gen kiểm chế khối u. Chiến lược này có thể khôi phục lại các chức năng bình thường của một gen kiểm chế khối u khiếm khuyết hoặc loại bỏ chức năng bất thường của một oncogene.

Một trong số các nghiên cứu lớn nhất về gen kiểm chế khối u là p53. Gen p53 mã hóa cho yếu tố phiên mã tác động đến hàng trăm thành phần promoter khác nhau, nhiều thành phần thuộc các gen có liên quan đến sự điều hòa chu kỳ tế bào hay apoptosis. Trên 50% ung thư trên người là có đột biến ở p53. Nhiều khối u do đột biến p53 này lại kháng lại khá mạnh với các trị liệu thông thường như hóa trị hay xạ trị ion hóa. Roth và cộng sự là nhóm nghiên cứu đầu tiên chứng minh trong một TNLS rằng việc thay thế gen kiểm chế khối u có thể gây cảm ứng làm thu nhỏ khối u ở những bệnh nhân ung thư. Trong nghiên cứu này, các bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (non-small cell lung cancer – NSCLC) đã được xử lý với vec tơ retrovirus có chứa gen p53 dạng hoang dã dưới sự kiểm soát của  $\beta$ -actin promoter. Ba trong số 7 bệnh nhân được khảo sát thấy có các dấu hiệu thoái lui khối u; không thấy các bằng chứng về độc tố liên quan đến vec tơ. Những giới hạn trong nghiên cứu này đều phát sinh từ hiệu ứng tải nạp thấp của các vec tơ retrovirus cũng như những khó khăn trong việc sản xuất các virus có độ chuẩn cao.

Một TNLS tương tự liên quan đến NSCLC được thực hiện sau đó là việc sử dụng các vec tơ adenovirus khiếm khuyết sao chép có chứa gen p53 dạng hoang dã. Cách tiếp cận này đã làm ổn định bệnh trong 64% bệnh nhân và 8% bệnh nhân có đáp ứng phần nào.

Gen trị liệu p53 đã được nghiên cứu trong các mô ung thư khác và nhiều công trình đã thu được những kết quả khích lệ. Các mô ung thư như vú, não, tuyến tiền liệt, trực kết tràng, tụy, tuyến giáp, tử cung, buồng trứng, đầu và cổ đã thể hiện lợi thế tiềm năng với gen trị liệu gen p53.

Nhiều nghiên cứu sử dụng các virus ly giải ung thư dựa trên cơ sở thiếu hụt p53 đặc trưng cũng quan sát thấy trong nhiều ung thư. Adenovirus có khả năng sao chép được công nghệ hóa gen đầu tiên để chọn lọc khối u dựa trên nền tảng biệt hóa p53 là ONYX-015. Hiệu quả của ONYX-015 lúc đầu được cho là do sự sao chép chọn lọc của nó trong các TB khối u có chứa p53 bất hoạt. Tuy nhiên, những dẫn liệu gần đây cho thấy ONYX-015 lại sao chép trong các TB khối u với bất kỳ trạng thái nào của p53. Vai trò của trạng thái p14<sup>ARE</sup> trong sao chép chọn lọc của ONYX-015 cũng là một đề tài gây tranh cãi.

Các gen kiểm chế khối u khác cũng đang được nghiên cứu cho gen trị liệu bao gồm gen nhạy cảm u nguyên bào võng mạc (Rb), pHyde, p16, p21 và MDA-7. Rất giống với p53, chỉ cần một đột biến của pRb cũng có thể làm mất điều hòa tăng trưởng và/hoặc apoptosis. Gen trị liệu pRb được chỉ rõ là làm giảm tiến trình biến nạp

ở nhiều mô chuột Rb<sup>+/-</sup> cũng như kiểm chế di căn phổi. Dùng một adenovirus biểu hiện dạng hoạt hóa cơ bản của pRb cũng thấy hiệu quả trong điều trị các bệnh tăng sinh mạch máu của người.

Gen kiểm chế khối u được phân dòng gần đây là pHyde đã thể hiện chức năng tiền apoptosis của nó trong các dòng TB ung thư tuyến tiền liệt. Thâm nhiễm các dòng tế bào PCa của người với adenovirus biểu hiện pHyde đã làm ức chế tăng sinh *in vitro* cũng như kiểm chế sự tăng trưởng của khối u ghép ngoại lai *in vivo*. Sở dĩ nó ức chế được bởi vì có sự cảm ứng apoptosis và rõ ràng là phụ thuộc vào sự hoạt hóa của caspase 3.

Gen p16 (*INK4a*, *CDKN2*, *MTS*) được sắp xếp ở vùng nhiễm sắc thể 9P21. p16 cũng được biết như là một gen kiểm chế khối u chủ yếu được phân lập và xác định đặc tính từ các nghiên cứu về Adp53. Nó mã mã hóa một protein gắn đặc hiệu và ức chế kinase 4 phụ thuộc cyclin (CDK4) và CDK6. CDK là các enzym thiết yếu mà hoạt tính của nó được điều tiết rất chặt chẽ bằng việc phosphoryl hóa protein gắn kết cùng các protein khác được gọi là các cyclin. Sự hoạt hóa phức hợp CDK-cyclin là để đáp ứng cho sự tiến triển chu kỳ tế bào thông qua sự phosphoryl hóa pRb. Trái lại, các chất ức chế CDK bao gồm p15, p16, p21 và p27 lại ngăn chặn sự hoạt hóa phức hợp CDK-cyclin. Vì vậy, khi pRb phosphoryl hóa thấp thì vẫn gắn vào yếu tố phiên mã E2F, dẫn đến dừng chu kỳ tế bào ở pha G1 và ức chế ở pha S. Sự hoạt hóa bất thường CDK hay sự biểu hiện quá mức cyclin có thể dẫn đến mất kiểm soát tăng trưởng đặc trưng ung thư.

Người ta cũng chứng minh rằng mức p16 tăng dần dần khi các tế bào đi đến lão hóa để phản ứng lại sự hoạt hóa Ras. Sự tác động này được thiết lập cũng dựa trên nền tảng là vai trò của một gen kháng u. p16 cũng có liên quan đến các quá trình cơ bản khác của tế bào như sự sinh mạch máu, sự xâm lấn của khối u, sự ức chế tiếp xúc và apoptosis.

Gen kiểm chế khối u p16 là một tác nhân điều hòa âm quan trọng của chu kỳ tế bào, khi bị mất chức năng thì nó có thể góp phần đáng kể vào việc biến đổi ác tính. Biểu hiện quá mức p16 sẽ làm dừng sự phân chia tế bào ở các dòng tế bào có protein pRb nguyên vẹn. Nhiều khối u bao gồm ung thư tế bào chuyển tiếp (transitional cell carcinoma), u sắc tố, bệnh bạch cầu, u thần kinh đệm đều có liên quan đến sự loại bỏ đồng hay dị hợp tử vùng 9P21.

Những đột biến tinh tế của gen p16 cũng được báo cáo trong nhiều dòng TB khối u cũng như trong một số khối u tiên phát. Những biến đổi dòng mầm của p16 cũng phát hiện thấy ở một số tiểu quần thể bệnh nhân u hắc sắc tố có tính chất gia đình. Tuy nhiên, sự đứt đoạn p16 cũng được phát hiện trong các u não, bệnh bạch cầu tế bào T người trưởng thành, bệnh u lympho huyết cấp thời thơ ấu, NSCLC, u trung biểu mô ác tính tiên phát, ung thư tuyến tiền liệt và các dòng TB ung thư tế bào tụy của người.

Tính về tầm quan trọng của p16 với tư cách là một gen kiểm chế khối u, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện trên cơ sở tải nạp p16 qua trung gian adenovirus trong ung thư phổi, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tụy, u nguyên bào đệm, ung thư tế bào vảy đầu và cổ và u hắc sắc tố với các mức độ thành công khác nhau. Dường như là việc chuyển giao tới tất cả các TB khối u đều đòi hỏi phương pháp này.

Một gen khác là một tác nhân điều hòa âm sự phosphoryl hóa Rb là p21 (cũng được gọi là *WAF1*, *CAP20*, *Cip1* và *Sdi1*). p21 là thành viên sáng lập họ Cip/Kip của các CKI bao gồm p27 và p54. Vì là một chất ức chế CDK nên p21 thực hiện chức năng bằng cách gắn và làm bất hoạt một thành viên của phức hợp cyclin/CDK liên quan đến sự chuyển tiếp G1-S trong chu kỳ tế bào. Bằng cách ngăn chặn các CDK khỏi sự phosphoryl hóa các đích của chúng thì chu kỳ tế bào sẽ bị dừng lại. p21 là

trung gian làm dừng chu kỳ tế bào với cả phương thức phụ thuộc và không phụ thuộc p53.

Với các tình huống bình thường thì p21 được cảm ứng sau khi có sự hủy hoại DNA và cảm ứng này đã ngăn chặn sự tiến triển chu kỳ tế bào từ pha G1 đến pha S. Sự dừng này trong chu kỳ tế bào cho phép xảy ra việc sửa chữa DNA trước khi có sự sao chép DNA ở pha S. p21 cũng được chỉ rõ là ức chế cả sao chép và phosphoryl hóa DNA phụ thuộc PCNA.

Nhiều nghiên cứu đã gợi lên rằng p21 biểu lộ đặc tính tiền apoptosis dưới những điều kiện xác định ở các hệ thống đặc biệt. Việc sử dụng p21 như một tác nhân kháng u trong nhiều dòng TB ung thư người cũng đã được báo cáo. Đưa p21 vào trong các TB ung thư tuyến tiền liệt người, u não, ung thư thực quản và ung thư kết tràng có thể ức chế đáng kể sự tăng trưởng và sinh u của tế bào. p21 cũng có thể làm tăng cường đáp ứng apoptosis đối với tác nhân hóa trị liệu cisplatin trong u thần kinh đệm và các dòng tế bào ung thư buồng trứng. Biểu hiện quá mức p21 sẽ làm thúc đẩy apoptosis cảm ứng bởi C6-ceramid trong dòng tế bào ung thư tế bào gan người thiếu hụt p53. Khi tải nạp các dòng tế bào ung thư cổ tử cung với các adenovirus biểu hiện p21 sẽ làm ức chế tăng trưởng và apoptosis. p21 cũng được chỉ rõ là thúc đẩy apoptosis qua trung gian Fas/CD95.

Tóm lại, có thể thấy rằng việc thay thế gen kiểm chế khối u là một phương thức trị liệu hứa hẹn, trong đó p53 và p21 là hứa hẹn nhất cho tới thời điểm này. Mặc dầu đã có bằng chứng là có hoạt tính người ngoài cuộc qua trung gian p53 nhưng việc làm giảm bớt những đòi hỏi về việc chuyển gen tới các tế bào trong khối u cũng không ngoại trừ với các trị liệu qua trung gian p16 hoặc p21.

### **CÁC THỬ NGHIỆM LÂM SÀNG GEN TRỊ LIỆU p53**

Có nhiều cách tiếp cận GTL trong TNLS hiện nay. Nhiều cách tiếp cận dựa trên cơ sở thay thế các gen khiếm khuyết bằng gen có chức năng dạng hoang dã như gen p53 chẳng hạn. Trong tất cả các gen kiểm chế khối u đang được nghiên cứu trong GTL ung thư thì p53 là hy vọng nhất. Gen trị liệu p53 có tiềm năng lớn đối với các TB khối u biểu hiện p53 dạng hoang dã vì nó thường làm nhạy cảm hơn các tác nhân hóa trị và xạ trị đối với các TB mất chức năng p53. Phương pháp p53 áp dụng hiệu quả trong ung thư đầu và cổ, ung thư buồng trứng và ung thư phổi.

Như đã đề cập ở trên, Roth và cộng sự lần đầu tiên sử dụng GTL lâm sàng p53. Nhóm nghiên cứu này đã sử dụng một vec tơ retrovirus để chuyển giao gen p53 hoang dã tới 9 bệnh nhân NSCLC, những người mà trước đây đã không thành công với các trị liệu thông thường. Ngoài độ an toàn và tính khả thi, những kết quả cũng chỉ rõ có sự thoái lui khối u ở 3 bệnh nhân và 3 bệnh nhân khác thì ổn định tăng trưởng khối u.

Swisher và cộng sự cũng đã thực hiện một nghiên cứu tương tự liên quan đến sự chuyển gen p53 qua adenovirus. Trong nghiên cứu này, 28 bệnh nhân NSCLC đã được xử lý với Adp53, kết quả có 64% bệnh nhân bệnh ổn định và 8% bệnh nhân có đáp ứng một phần.

Ung thư tuyến tiền liệt cũng rất phù hợp với gen trị liệu p53. Một nghiên cứu đã điều trị 30 bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt bằng Adp53 được chuyển giao bằng cách tiêm vào trong tuyến tiền liệt. Những kết quả của nghiên cứu này đã chứng minh có sự sản xuất protein p53 mà không có kèm theo hiệu ứng phụ đáng kể nào.



Chuyển gen p53 cũng được nghiên cứu với sự kết hợp cùng các thuốc hóa trị liệu. Về mặt lâm sàng thì phương pháp này cũng được khảo sát ở NSCLC, ở ung thư đầu và cổ, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, di căn gan từ ung thư kết tràng. Gen trị liệu Adp53 cũng được nghiên cứu với sự kết hợp cùng trị liệu phóng xạ. NSCLC cũng được quan tâm nhiều trong cách tiếp cận này.

Cách tiếp cận khác lợi dụng các lợi thế của gen trị liệu p53 là phát triển vaccin ung thư. Chẳng hạn như nghiên cứu pha I/II hiện đang được thiết kế với việc sử dụng vaccin Adp53 – tế bào dendritic tự thân sau hóa trị chuẩn để điều trị giai đoạn mở rộng của NSCLC. Phương pháp này sử dụng các tế bào dendritic của bệnh nhân và một adenovirus biểu hiện p53 để kiến tạo nên một vaccin. Trên thực tế, các cách tiếp cận GTL có thể được áp dụng nhằm khai thác khả năng của hệ miễn dịch để loại bỏ ung thư.

### **CÁC TRỊ LIỆU KẾT HỢP**

Gen trị liệu tiền apoptosis kết hợp với các trị liệu khác thường cho các hiệu ứng đồng thuận. Gen trị liệu p53 đã được kết hợp cùng các trị liệu khác như hóa trị, phóng xạ ion hóa, các chất ức chế histon deacylase và trị liệu đa gen. Các trị liệu tiền thuốc-enzym như herpes simplex virus- TK hoặc CD đã thể hiện các lợi ích khi kết hợp với các trị liệu gen khác, chẳng hạn như trị liệu gen tự sát herpes simplex virus –TK đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu trị liệu đa gen, bao gồm các gen mã hóa yếu tố sinh kháng tạo mạch, các connexin, cytokin, caspase và trị liệu gen tự sát kép.

Các chiến lược sử dụng các gen apoptosis như Bax cũng rất có lợi nếu như kết hợp với các tác nhân khác. Lee và cộng tác đã chỉ rõ rằng virus herpes simplex biểu hiện Bax đã làm tăng cường hiệu lực điều trị BCNU trong mô hình u thần kinh đệm chuột. Trị liệu đa gen Bax cũng được nghiên cứu với sự kết hợp cùng Bad và p53. Những phân tử apoptosis bổ sung như FasL hay TRIAL cũng biểu lộ các hiệu ứng đồng thuận khi kết hợp với các phương thức trị liệu khác như doxorubicin hoặc p53.